

Az mTOR (mammalian target of rapamycin) aktivitás jelentősége humán lymphomákban

Márk Ágnes

Semmelweis Egyetem, Patológiai Tudományok Doktori Iskola, Budapest

Témavezető: Dr. Sebestyén Anna

A neopláziás folyamatok kialakulása, a daganat növekedése, a daganatsejtek proliferációja és túlélése hátterében gyakran különböző jelutak magváltozott aktivitása áll. A PI3K/AKT/mTOR jelút fokozott aktivitása szolid daganatokban és köpenysejtes lymphomákban a daganatkialakulás és -növekedés fontos szabályozója. Az aktív mTOR (mammalian target of rapamycin) kináz két komplex (mTORC1, mTORC2) meghatározó eleme. Az mTOR-aktivitás szerepét vizsgáltuk különböző humán lymphomákban, összefüggéseket keresve a betegek klinikai adataival. Hodgkin-lymphomákban (HL) tanulmányoztuk, hogy a magas mTOR-aktivitás milyen, a daganat túlélésében fontos folyamatokban vesz részt (antiapoptotikus mechanizmusok és mikroenvironmenti változások). Meghatároztuk azokat a humán lymphomatípusokat, amelyekre magas mTOR-aktivitás jellemző. Kimutattuk, hogy a mitotikus lymphoid sejtek mTOR-aktivitása magasabb, mint a nem osztódó sejteké. Nagyobb esetszámot tartalmazó TMA-blokkokon (tissue microarray) tovább vizsgáltuk a diffúz nagy B-sejtes lymphoma (DLBCL) és a HL eseteket. Szignifikáns összefüggést mutattunk ki DLBCL-s betegek altípusmegoszlása (csíráközpont-eredetű és nem csíráközpont-eredetű DLBCL-ek) és az mTOR-aktivitás között. DLBCL-ban a fokozott mTOR-aktivitás negatív prognosztikus markernek bizonyult. A HL-ek 92%-a magas mTOR-aktivitást mutatott (mTORC1-hez köthető), ami prognosztikus faktorként nem, viszont terápiás célpontként felhasználható. A HL-ek mikroenvironmentének vizsgálata szerint a regulátor T-sejtek mennyisége a mikroenvironmentben, valamint a galektin-1-expresszió a tumorsejtekben és az extracelluláris mátrixban emelkedett. A magas mTOR-aktivitás és a galektin-1-expresszió között kapcsolatot találtunk in vitro kísérleteinkben, ahol az mTOR gátlása transzlációs szinten csökkentette a galektin-1-expressziót. Az mTOR-gátlás jelentőségét – proliferációgátló és apoptotikus hatását – humán lymphoma xenograftokban (HL, DLBCL, Burkitt-lymphoma) bizonyítottuk. In vitro kombinációs kezeléseknél a rapamycin apoptotikus hatást fokozó szerepét igazoltuk. Munkánkban meghatároztuk azokat a lymphomatípusokat, amelyekben az mTOR-gátlás célzott terápiaként alkalmazható lehet. Eredményeink alapján annak meghatározása, hogy melyik komplexhez köthető az mTOR-aktivitás, nagyon fontos a megfelelő mTOR-gátló (klasszikus vagy kettős gátlók) kiválasztásában. A jövőben a magas mTOR-aktivitást mutató lymphomákban várhatóan kombinációs kezelésben az mTOR-gátlók használata hozzájárulhatna a jobb túlélési eredmények eléréséhez és lehetőség szerint a jelenlegi kezelések dózisainak és toxikus mellékhatásainak csökkentéséhez. Magyar Onkológia 58:143–148, 2014

Kulcsszavak: lymphoma, Hodgkin-lymphoma, diffúz nagy B-sejtes lymphoma, mTOR kináz aktivitás, prognózis, regulátor T-sejtek, galektin-1

Neoplastic processes, tumor growth, and tumor cell proliferation and survival are often due to the altered activation of different signaling pathways. The increased activity of PI3K/AKT/mTOR signaling has been shown to be an important regulator of tumor growth in several solid tumors and in mantle cell lymphomas. The active form of mTOR kinase (mammalian target of rapamycin) is a key signaling molecule, and it exists in two different complexes, mTORC1 and mTORC2. In the present work, mTOR activity was investigated in different lymphoma types, in parallel with clinical data. We also examined in Hodgkin lymphomas (HL) the role of mTOR activity in survival mechanisms such as antiapoptotic protein expression and alterations in the microenvironment. We

Levelezési cím: Márk Ágnes, Semmelweis Egyetem, I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutatató Intézet,
1085 Budapest, Üllői út 26. E-mail: markagi@korb1.sote.hu

Közlésre érkezett: 2013. november 20. • Elfogadva: 2013. december 5.

determined which lymphoma types display characteristic high mTOR activity in our TMA (tissue microarray) study. We observed that mTOR activity is increased in mitotic lymphoid cells compared to interphasic cells. The number of diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) and HL cases was extended in a further set of TMA. We observed significantly higher mTOR activity in the non-centrum germinativum derived subtype of DLBCL than in the centrum germinativum derived subtype, which was a prognostic marker; 63% of mTOR active cases showed Rictor overexpression, indicating mTORC2 activity. High mTOR activity was also established in 92% of HL cases, which was linked to mTORC1. This finding was not a prognostic marker, however, it can be useful in targeted therapy. We observed the overexpression of the antiapoptotic protein BCL-xL and NF- κ B-p50 in the majority of mTOR active HLs. HLs showed high numbers of regulatory T cells in the microenvironment and high expression of galectin-1 in tumor cells and in the extracellular matrix, when compared to reactive lymph nodes. We confirmed that mTOR inhibition had significant antiproliferative and antiapoptotic effects in lymphoma cell lines and in lymphoma xenografts (HL, DLBCL, Burkitt lymphoma). We also showed that rapamycin was able to augment the effect of chemotherapeutic agents and TGF- β . Taken together, mTOR activity may be a potential therapeutic target in different lymphoma types. However, patient and inhibitor selection criteria must be carefully considered. The combination of mTOR inhibitors with other agents will probably offer the highest efficiency for achieving the best clinical response, and may also allow dose reduction in order to decrease late treatment toxicity in these cases.

Márk Á. Significance of mTOR (mammalian target of rapamycin) activity in human lymphomas. *Hungarian Oncology* 58:143–148, 2014

Keywords: lymphoma, Hodgkin lymphoma, diffuse large B-cell lymphoma, mTOR kinase activity, prognosis, regulatory T-cell, galectin-1

BEVEZETÉS

Az mTOR kináz számos jelút aktiváló és inaktíváló üzenetet integrálja, befolyásolja a sejtek osztódását, táplálékellátását, energiahelyzetét és a stresszre adott válaszát. Az mTOR kináz aktivitása két komplexhez köthető, melyek a jelútban elfoglalt helyük alapján és funkcionálisan is különböznek egymástól. Az mTOR-komplex 1 (mTORC1) alkotófehérjei az mTOR, a Raptor, a mLST8, a PRAS40 és a Deptor. Az mTOR-komplex 2 (mTORC2) elemei az mTOR, a Rictor, a mLST8, a mSin1, a Protor és a Deptor fehérjék. Az mTORC1 két legfontosabb célmolekulája a riboszomális S6 kináz 1 (S6K1) és a 4E-kötő fehérje (4EBP1). Az S6K1 foszforilálja a riboszomális S6 fehérjét (S6), ezzel elősegítve a riboszóma-biogenezist. Miután az mTORC1 foszforilálja a 4EBP1-et, az leválik a transláció iniciációs faktoráról (eIF4E). Ezzel főként olyan molekulák translációja válik lehetővé, amelyek proliferációs és túlélési szignálokat támogatnak (c-myc, BCL-2, FGF-2, survivin, cyclin-D1). Az mTORC2 célfehérjei közé az AKT mellett számos AGC-kináz tartozik, emellett részt vesz a sejt migráció szabályozásában is.

Bizonyos hematológiai daganatokban (leukaemiák, köpenysejtes lymphoma, myeloma multiplex) már kimutattak olyan változásokat, amelyek a PI3K/AKT/mTOR út fokozott aktivitásának hátterében állnak. Azonban még mindig kevés adat áll rendelkezésünkre a legtöbb lymphoma esetében a jelút aktivitásáról.

Az mTOR kináz klasszikus gátlószere a rapamycin (rapamune/sirolimus) és származékai, a rapalógok (tem-

sirolimus, everolimus, deforolimus). A rapalógok mellett napjainkban új generációs kettős mTORC1/mTORC2-gátlók, köztük PI3K/mTOR-, illetve AKT/mTOR-gátlók fejlesztése és preklinikai vizsgálata folyik.

Vizsgálatainkban a lymphomák két csoportját részletebben tanulmányoztuk. Ezek a non-Hodgkin-lymphomák 30-40%-át alkotó diffúz nagy B-sejtes lymphomák (DLBCL), melyekre jellemző a biológiai heterogenitás. A jelenlegi kemoterápiás kezelés mellett a DLBCL-s betegek 60-80%-ában érhető el teljes remisszió, az 5-10 éves túlélés 50-70%. A DLBCL-ek génexpressziós profiljuk alapján két csoportra oszthatók. Az egyik kategória expressziós profilja a csíráközpont sejtjeihez (GC-DLBCL), a másiké a perifériás aktivált B-sejtek (ABC/non-GC-DLBCL) profiljához hasonlít. A másik vizsgált lymphomatípus a Hodgkin-lymphoma, amely monoklonális, B-sejt-eredetű daganatos megbetegedés, gyakran fiatalokat érint. A klinikai gyakorlat alapján a klasszikus HL-s betegek 70-80%-a gyógyul meg, az ötéves túlélés 85-88%. A terápiás sikerekhez azonban mellékhatások, szövődmények is társulnak. A hosszú távú sugárkezelésben részesülő betegeknél jelentősen megemelkedik más malignus daganatok kialakulásának kockázata (tüdőrák, melanoma, emlőrák, lymphoma). A Hodgkin-/Sternberg-Reed-sejtek (HRS) egyedi mikrokozmoszt szerveznek maguk köré, melynek alapvető szerepe van a tumor progressziójában. A mikrokozmoszt sejtjei bonyolult kapcsolatban vannak egymással és a tumorsejtekkel, egyrészt kölcsönösen elősegítve a szomszédos sejtek aktivációját és proliferációját, másrészt kialakítva a daganat immunrendszerrel szembeni védekezését. A leggyakoribb sejtípus ebben a mikrokoz-

nyezetben a 2-es típusú helper T-sejt (Th2) és a regulátor T-sejt (Treg). A HRS-sejtek specifikus kemokinek termelésével vonzzák maguk köré ezeket a CD4+ T-sejt-formákat. A HRS sejtek által termelt galektin-1 is részt vesz a T-sejtek szelekciójában, apoptózist indukál a reaktív T-sejtekben, ezzel visszaszorítva a gyulladást és gátolva az autoreaktivitást. Emellett a galektin-1 az IL-10-termelés támogatásával segíti a Treg-sejtek proliferációját és a Th2 típusú immunválaszt.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Az mTOR jelút számos daganat esetén a tumorsejtek túlélését biztosító mechanizmusok kulcsszereplője. Humán lymphomákban eddig még kevés adat áll rendelkezésünkre aktivitásáról, ezért célul tűztük ki a különböző lymphomák mTOR-aktivitásának vizsgálatát.

1.1. A lymphomákon belül a diffúz nagy B-sejtes lymphomákat (DLBCL) és a Hodgkin-lymphomákat (HL) magas esetszámú vizsgálatokban a betegek klinikai adatai és az mTOR-aktivitás közti összefüggések keresése céljából részletesen vizsgáltuk.

1.2. HL-ekben vizsgálni kívántuk, hogy a magas mTOR-aktivitás milyen sejtfunkciókkal lehet összefüggésben. Mutat-e kapcsolatot az antiapoptotikus fehérjék expressziójával és befolyásolja-e a HL-ekre jellemző mikro környezet kialakítását.

1.3. mTOR-gátlás hatásának vizsgálata in vitro lymphomasejtvonalakban és in vivo lymphoma xenograft modellekben (proliferáció, apoptózis és fehérjeexpresszió változásainak követése).

2. HL-ek mikro környezetét alkotó sejtek összetételének vizsgálata különös tekintettel a Treg-sejtek jelenlétére. Treg-sejtek és a tumorsejtek kapcsolatának vizsgálata, ebben a galektin-1 szerepének tanulmányozása.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

TMA (tissue microarray) metszeteken vizsgáltuk különböző lymphoma-entitások (4 Burkitt-lymphoma (BL), 23 HL, 11 MCL, 9 anaplasias nagy sejtes lymphoma (ALCL), 10 DLBCL, 12 marginális zóna-lymphoma (MZL), 13 krónikus lymphoid leukaemia (CLL), 10 follikuláris lymphoma (FL) és 12 perifériás T-sejtes lymphoma) mTOR-aktivitását. Nagyobb esetszámú TMA-vizsgálatokban is meghatároztuk az mTOR-aktivitást, valamint vizsgáltuk az mTORC1/mTORC2 komplexekre jellemző Raptor és Rictor fehérje expresszióját DLBCL-ekben (68 eset) és HL-ekben (83 eset). Tanulmányoztuk HL-ekben a T-reg-sejtek mennyiségét, a galektin-1 és antiapoptotikus fehérjék expresszióját. Az mTOR-aktivitás és a klinikai adatok 83 HL (40 nő, 43 férfi, életkor: 8–82 év, átlagéletkor: 29,8 év) és 68 DLBCL (34 nő,

34 férfi, életkor: 13–87 év, átlagéletkor: 59 év) esetében statisztikai módszerekkel vizsgáltuk.

Lymphoma- és leukaemia-sejtvonalak (HL, BL, DLBCL, B-ALL, T-ALL sejtvonalak) mTOR-aktivitását különböző módszerekkel [ELISA, Western blot (WB), immuncitokémia (ICC)] határoztuk meg az aktív mTOR kináz és foszforilált célfehérjéinek kimutatásával. A galektin-1-expressziót RNS-, (real-time PCR) és fehérjeszinten (WB, ICC) is vizsgáltuk.

In vitro lymphomasejtvonalak kezelését végeztük el a következő szerekkel: nocodazole (40–200 ng/ml), staurosporin (0,1 M/ml), rapamycin (50 ng/ml), kettős gátlók [NVP-BEZ-235 (1 μM/ml), PP-242 (1 μM/ml)], doxorubicin (100 nM), vincristine (3 nM), etoposid (100 nM). A sejtek morfológiáját hematoxilin-eozinnal festett citospinpreparátumokon vizsgáltuk, a kezelések hatását a sejtek viabilitására áramláscitometriai mérés és proliferációs teszttel határoztuk meg. HL, BL és DLBCL xenograftokat hoztunk létre SCID egerekben. Az mTOR-gátlás (rapamune: 3 mg/kg) tumornövekedésre és fehérjeexpresszióra gyakorolt hatását vizsgáltuk a xenograftokban.

Statisztikai analízis során az adatok számtani átlaga és standard deviációja került kiszámításra. A szignifikancia meghatározása t-próbával és Mann-Whitney-teszttel történt (p értéke <0,05). A betegek klinikai adatai és a különböző IHC-eredmények közti szignifikáns összefüggéseket khi2-próbával (log-rank teszt) határoztuk meg.

EREDMÉNYEK

mTOR-aktivitás a különböző lymphomasejtvonalakban és humán biopsziás mintákban

Valamennyi lymphomasejtvonalba kimutattuk az mTOR expresszióját, ebben jelentős eltérést a sejtvonalak és a normális sejtek között nem tapasztaltunk. Különböző lymphoma- és leukaemia-sejtvonalakban az mTOR aktív formájának (p-mTOR) és foszforilált célmolekuláinak (p-4EBP1, p-p70S6K, p-S6) kimutatásával, mennyiségi vizsgálatával határoztuk meg az mTOR-aktivitást ELISA, immuncitokémia és Western blot módszerekkel. A lymphoma- és leukaemia-sejtvonalak szignifikánsan nagyobb mennyiségű p-4EBP1 fehérjét expresszáltak, mint a normális B- és T-sejtek, ami emelkedett mTOR-aktivitásukra utal (ELISA). Párhuzamosan az aktív mTOR kináz (p-mTOR) fehérje mennyisége, illetve foszforilált, indirekt célmolekulája, a p-S6 fehérje is magas expressziót mutatott a különböző daganatos sejtvonalakban (ICC, WB).

Mitotikus lymphoid sejtek mTOR-aktivitása

A mitotikus lymphoma- és normális lymphoid sejtekben magasabb mTOR-aktivitást mutattunk ki, mint az interfázisban lévő normális és tumoros lymphoid sejtelalakok-

ban. Kettős immuncitokémiai és immunhisztokémiai reakciókkal igazoltuk a mitotikus sejtek fokozott mTOR-aktivitását humán lymphomabiopsziákban és lymphoma-leukemia sejtvonalakban.

Humán lymphomabiopsziák mTOR-aktivitásának vizsgálata immunhisztokémiával

A perifériás T-sejtes lymphomák, a MZL-ek és a CLL-ek esetében a minták túlnyomó többségében gyenge vagy negatív immunhisztokémiai reakciókat kaptunk. Bizonyos lymphomatípusok – ide tartozik a HL, a DLBCL, az ALCL, MCL és a BL – magas mTOR-aktivitást mutattak.

Magas mTOR-aktivitás jellemezte a DLBCL-s betegek 62%-át. A non-GC típusra (80%-ban, 40/50) volt jellemző ez a magas mTOR-aktivitás, míg a jelenlegi kezelési lehetőségek mellett jobb prognózisú csíráközpont-eredetű DLBCL-ek (GC-DLBCL) esetében gyakorlatilag nem tudunk mTOR-aktivitást kimutatni. Értékeljük a két különböző mTOR-komplexre jellemző fehérje, a Raptor és a Rictor IHC-reakciókat is. Az mTOR-aktivitást mutató esetek közel kétharmadát (63%) jellemezte magas Rictor-expresszió, illetve a Raptorhoz képest domináns Rictor-expresszió. Összefüggést találtunk a betegek túlélési adatai és az mTOR-aktivitás között. Az emelkedett mTOR-aktivitás szignifikáns negatív prognosztikai faktorként jellemezte a betegséget. A legrosszabb túlélési eredményeket az mTORC2-höz (Rictor-overexpresszió) kapcsolható mTOR-aktivitású esetekben találtuk.

A Hodgkin-lymphomákat általánosan magas mTOR-aktivitás jellemezte (77/83, 93%) a szövettani altípustól függetlenül. Az összes vizsgált esetet (n=83) elemezve az alacsony mTOR-aktivitást mutató betegek teljes túlélése a hatéves követési periódusban 100% (6/6), a magas mTOR-aktivitású betegeké 85% (66/77) volt, ez a különbség nem szignifikáns az alacsony mTOR-aktivitású betegek kis száma miatt. HL-ekben nem jellemző az mTORC2 jelenléte, 83 beteg mintáját megvizsgálva csak 1 esetben tudunk jelentősebb Rictor-expressziót kimutatni.

Antiapoptotikus fehérjék és a mikro környezet bizonyos tényezőinek vizsgálata HL-ekben

Immunhisztokémiai eredményeink alapján a BCL-xL antiapoptotikus fehérje expressziója és a magas mTOR-aktivitás összefüggést mutatott, azonban Fisher's exact teszttel nem tudunk szignifikáns korrelációt igazolni (p=0,07).

HL-ekben a tumorsejtek mikro környezetében nagy mennyiségű FOXP3-pozitív regulátor T-sejtet (Treg-sejt) mutattunk ki. Összehasonlítottuk a vizsgált biopsziás mintákon belül a tumorsejtben (HRS) gazdag és tumorsejtmentes területeken a Treg-sejtek gyakoriságát.

Szignifikánsan nagyobb mennyiségben fordultak elő Treg-sejtek a HRS-sejtek közvetlen környezetében, mint a tumorsejtektől távolabbi területeken. A Treg-sejtek mennyisége és a betegek prognózisa korrelációt mutatott. Azok az esetek, ahol a tumorsejtek mikro környezetében a Treg-sejtek mennyisége meghaladta az összes sejt 17%-át, az 5 éves túlélés 100%-os volt.

A galektin-1 fehérjének jelentős expresszióját figyeltük meg a tumorsejtekben és az extracelluláris térben egyaránt az esetek többségében (63/73, 86%). Két esetben az alacsony mTOR-aktivitás és az alacsony galektin-1-expresszió együtt jelent meg. Megvizsgáltuk az extracelluláris mátrixban is a galektin-1-expressziót. A galektin-1-expressziós mintázat nem mutatott különbséget a különböző HL-altípusok esetében. Megfigyeltük, hogy a HRS-sejtek mikro környezetében a jelentős extracelluláris galektin-1-expresszió magas Treg-sejt-mennyiséggel párosult. Abban az esetben, amikor az ECM-ben alacsony volt a galektin-1-expresszió, a Treg-sejtek mennyisége is alacsonyabb volt.

A HL-sejtvonalakban is jelentős galektin-1-expressziót mutattunk ki. Rapamycinnel kezelt HL-sejtekben realtime PCR és Western blot technika segítségével követtük a galektin-1 mRNS- és fehérjeexpresszió változását. Transzlációs szinten az mTOR-gátló kezelés csökkentette a tumorsejtek galektin-1-termelését. A xenograftkísérletekből származó tumorminták galektin-1 IHC-festése segítségével igazoltuk, hogy az mTOR kináz gátlása csökkenti a tumorsejtek galektin-1-termelését *in vivo* is.

*mTOR-gátlók hatásának vizsgálata lymphomákban *in vitro* és *in vivo**

Különböző lymphoma-leukaemia sejtvonalakat kezeltünk klasszikus és új generációs mTOR-gátlókkal. Az indukált apoptózis és a proliferációgátlás mértékét 24–72 órás kezelés után vizsgáltuk (áramlási citometria, Alamar blue assay). Az mTOR-gátló kezelés után minden vizsgált lymphomasejtvonalban kifejezett G1-blokkot figyeltünk meg, ami proliferációgátlást eredményezett, de a spontán apoptózis mértéke ennyi idő alatt nem emelkedett. A rapamycin hatását hosszabb (96–120 h) kezelési idő után KMH2 (HL) és BHD1 (DLBCL) sejtvonalakban vizsgáltuk. A kezelés KMH2 sejtekben szignifikánsan növelte az apoptózis mértékét, míg BHD1 sejtekben csak proliferációgátlást tapasztaltunk.

Összehasonlítottuk a kettős gátlók (NVP-BEZ-235 és PP-242) és a rapamycin *in vitro* hatását HL és DLBCL sejtvonalakon. A kettős gátlók HL-sejtvonalakban és DLBCL-sejtekben is a rapamycinnél nagyobb mértékben csökkentették a sejtek proliferációját. Hosszú távú kezeléseknél a kettős gátló kezelés már a BHD1 sejtvonalban is apoptózist indukált.

Kombinációs kezelésekben a rapamycin fokozta a TGF- β apoptózist indukáló hatását és bizonyos, a TGF- β hatásával szemben rezisztens sejtekben helyreállította a TGF- β -érzékenységet is. A rapamycin HL-sejtekben *in vitro* fokozta az indukált apoptózis mértékét doxorubicin, vincristin és etoposide mellett adva.

Hodgkin-, Burkitt- és DLBCL-xenograftokban végeztünk mTOR-gátló kezeléseket rapalógokkal. A kezelések hatására mindhárom xenograftmodellben csökkent a tumorok növekedése a kontrollhoz képest. A tumornövekedés gátlásának hátterében a proliferációgátlással párhuzamosan apoptózisindukciót mutattunk ki.

Az mTOR-aktivitás *in situ* vizsgálata

Beállítottuk sejtvonalakon a p-S6 (aktív riboszomális S6 fehérje) és az mTORC2 komplex mennyiségi vizsgálatára a Duolink technikát. Bizonyítottuk, hogy a módszer adott foszoprotein (p-S6) mennyiségi változásait valóban kvantitatív módon képes meghatározni *in vitro* rapamycinkezelt sejtek citospinpreparátumain. Ezzel a technikával az mTOR-komplexek mennyiségének és aktivitásának a változása meghatározhatóvá válhat.

KÖVETKEZTETÉSEK

I. Vizsgálatainkban jellemeztük különböző lymphomatípusok mTOR-aktivitását.

- Igazoltuk a mitotikus normális lymphoid és lymphomasejteknek az interfázisban levő lymphoid sejtekénél magasabb p-S6-expresszióját, aminek hátterében a magasabb mTOR-aktivitás állhat.
- Kimutattuk, hogy a Burkitt, a köpenysejtes, az anaplázias nagy sejtes, a Hodgkin (HL) és diffúz nagy B-sejtes lymphomákat (DLBCL) magas mTOR-aktivitás jellemzi, míg a marginális zóna, a perifériás T-sejtes, valamint a kis lymphocytás lymphomákra (CLL) ez nem jellemző.
- A DLBCL-ekben igazoltuk, hogy a magas mTOR-aktivitás a non-GC altípusban fordul elő és a rossz prognózisú DLBCL-eket jellemzi.
- Jellemezve a DLBCL-ek mTOR-aktivitását, kimutattuk, hogy a magas mTOR-aktivitás az esetek 63%-ában mTORC2 komplex fokozott expressziójával jár. Statisztikailag elemezve a vizsgált esetekhez tartozó túlélési adatokat, igazoltuk, hogy a magas mTOR-aktivitású és mTORC2 komplexre jellemző Rictor-overexpressziót mutató esetek prognózisa szignifikánsan rosszabb.
- HL esetében kimutattuk, hogy a daganatsejtekre általánosan jellemző a magasabb mTOR-aktivitás. Az alacsony mTOR-aktivitású HL-ek (ezek aránya <10%)

esetében a betegek 5 évnél hosszabb betegségmentes túlélése 100%. HL-ekben eredményeink szerint a DLBCL-ekkel ellentétben nem jellemző a Rictor fokozott expressziója.

II. HL-ek esetében vizsgáltuk olyan, a lymphomasejtek túlélését segítő extra- és intracelluláris fehérjék expresszióját, egyéb mikrokörnyezeti tényezők szerepét, amelyek szabályozásában az mTOR-aktivitás változása is szerepet játszhat.

- Több antiapoptotikus fehérje *in situ* expresszióját vizsgálva, a Bcl-x1 és az NF κ B-p50 expresszióját a legtöbb magas mTOR-aktivitású HL esetben igazoltuk.
- Kimutattuk a regulátor T-sejtek túlélésében fontos fehérje, a galektin-1 fokozott expresszióját Hodgkin-lymphomasejtekben és extracellulárisan. Nem sikerült igazolnunk mások korábbi eredményeit, amely szerint a különböző HL lymphomaaltípusok galektin-1-expressziója különbözne.
- Kimutattuk, hogy HL-ekben a Treg-sejtek mennyisége a mikrokörnyezetben magasabb, mint a reaktív nyirokcsomókban. A Treg-sejtek nagyon magas aránya HRS-sejtekben gazdag területeken jó prognózisa utal.
- Igazoltuk HL-sejtvonalakban *in vitro* és *in vivo* is, hogy az mTORC1-aktivitás gátlása transzlációs szinten csökkenti a galektin-1 expresszióját.

III. *In vitro* és *in vivo* Hodgkin-lymphoma modellekben igazoltuk az mTOR-aktivitás szerepét a tumornövekedésben.

- Kimutattuk az mTOR-gátlók proliferációgátló és hosszú távon apoptózist indukáló hatásait humán *in vitro* lymphomasejtvonalakban és *in vivo* lymphomaxenograftokban.
- Vizsgáltuk különböző lymphomatípusok mTORC1 és mTORC2 komplexekre jellemző fehérjéit és a sejtvonalak mTOR-gátlók iránti érzékenységét. Vizsgálataink szerint a két komplex (mTORC1 és mTORC2) mennyiségi különbségei állhatnak az mTOR-gátlókkal szembeni különböző érzékenység hátterében.
- In vitro* vizsgálataink szerint az mTOR-gátlók képesek fokozni kemoterápiás szerek és más negatív szabályozók, mint pl. a TGF- β hatását is.

Összefoglalva, az mTOR-gátlók alkalmazásánál nem csak az mTOR-aktivitás meghatározását tartjuk fontosnak, ami a kezelés célpontjának igazolását jelenti az adott beteg daganatában, hanem azt is, hogy az mTOR melyik komplexének aktivitása jellemzi azt. Utóbbi meghatározása segítheti a kombinációs kezelésekhez használható legoptimálisabb mTOR-gátló szerek kiválasztását (rapalógok, kettős gátlók) a jövőben.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, dr. Sebestyén Annának, hogy munkacsoportjában dogozhattam értékes szakmai útmutatása alatt. Köszönöm dr. Kopper Lászlónak, hogy támogatta munkámat a Patológiai Doktori Iskola vezetőjeként. Köszönöm dr. Matolcsy András intézetvezetőnek, hogy munkámat az I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben végezhettem. Köszönöm munkatársaimnak a sok segítséget és a közös munkát. Ph.D. munkám az OTKA F048380, K68341, 81624 projektek keretében jött létre.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Márk Á, Hajdu M, Váradi Zs, Sticz TB, Nagy N, Csomor J, Berczi L, Varga V, Csóka M, Kopper L, Sebestyén A. Characteristic mTOR activity in Hodgkin-lymphomas offers a potential therapeutic target in high risk disease – a combined tissue microarray, in vitro and in vivo study. *BMC Cancer* 13:250, 2013

*Egervári G, *Márk Á, Hajdu M, Barna G, Sápi Z, Krenács T, Kopper L, Sebestyén A. Mitotic lymphoma cells are characterized by high expression of phosphorylated ribosomal S6 protein. *Histochem Cell Biol* 4:409–417, 2011 (*Egervári G és Márk Á mindketten első szerzőnek minősülnek)

Sebestyén A, Sticz TB, Márk Á, Hajdu M, Timár B, Nemes K, Nagy N, Váradi Z, Kopper L. Activity and complexes of mTOR in diffuse large B-cell lymphomas – a tissue microarray study. *Mod Pathol* 12:1623–1628, 2012

Nemes K, Sebestyén A, Márk Á, Hajdu M, Sticz T, Nagy E, Barna G, Váradi Zs, Kovács G, Kopper L, Csóka M. Mammalian target of rapamycin (mTOR) activity dependent phospho-protein expression in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Plos One* 8:e59335, 2013

Sápi Z, Füle T, Hajdu M, Matolcsy A, Moskovszky L, Márk A, Sebestyén A, Bodoky G. The activated targets of mTOR signaling pathway are characteristic for PDGFRA mutant and wild-type rather than KIT mutant GISTs. *Diagn Mol Pathol* 1:22–33, 2011

Kenessey I, Bánki B, Márk A, Varga N, Tóvári J, Ladányi A, Rásó E, Timár J. Revisiting CBI receptor as drug target in human melanoma. *Pathol Oncol Res* 4:857–866, 2012